Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

ÄTHANOL UND HÖHERE ALKOHOLE IM SERUM VON DIABETIKERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

RALPH HERBERT KALLMAYER

aus Bad Kreuznach

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0037

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

ÄTHANOL UND HÖHERE ALKOHOLE IM SERUM VON DIABETIKERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

RALPH HERBERT KALLMAYER

aus Bad Kreuznach

1980

Dekan: Prof. Dr. G. Rassner

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Schmülling
(Prof. Dr. M. Eggstein)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mein herzlicher Dank gilt

meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Eggstein
für die Überlassung des Themas,

Herrn Oberassistent Dr. H. M. Liebich für seine
Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen
und der Abfassung der Arbeit,

Herrn Oberassistent Dr. R. H. Maulbetsch aus der
Abteilung für Datenverarbeitung der Medizinischen
Universitätsklinik Tübingen für seine freundliche
Hilfe bei der Durchführung der statistischen
Berechnungen und

Herrn J. Wöll für seine Fürsorge für die technischen
Einrichtungen und vor allem für seine stete Hilfs-
bereitschaft bei der Lösung technischer Probleme.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Ziel der Arbeit	2
C	Methoden	4
1.	Apparative Ausstattung und Beschreibung der Geräte	4
1.1.	Gaschromatograph	4
1.1.1.	Bestimmung der höheren Alkohole	4
1.1.2.	Bestimmung von Äthanol	4
1.2.	Gekoppeltes Gaschromatographie-Massenspektrometriesystem	5
1.3.	Registriergeräte	6
2.	Geräteparameter	6
2.1.	Gaschromatograph	6
2.2.	Massenspektrometer	6
2.3.	Kompensationsschreiber-Einstellung	7
3.	Vorbereitung und Wartung der Geräte	7
4.	Chemikalien	8
4.1.	Standardsubstanzen	8
4.1.1.	Interne Standards	8
4.1.2.	Alkoholstandards	8
4.1.3.	Extraktionsmittel	8
4.1.4.	Reinigungsmittel	8
5.	Spezifität des Verfahrens	9
6.	Interner Standard	10
6.1.	Prinzip	10
6.2.	Erforderliche Kriterien	11
6.3.	Chemische Substanzen	11
6.4.	Ansetzen der Standardlösungen	12
7.	Herkunft des Untersuchungsmaterials und Gewinnung der Proben	12
8.	Aufbereitung der Proben für das Analyseverfahren	13

9. Durchführung der Analyse.....15
10. Beschreibung der Chromatogramme.....16
10.1. Höhere Alkohole.....16
10.2. Äthanol.....17
11. Auswertung.....20
11.1. Standardleerwert.....20
11.2. Quotientenermittlung.....22
12. Erstellung der Eichkurven.....23
12.1. Äthanol-Eichkurve.....23
12.1.1. Feststellung der Nachweisgrenze.....23
12.1.2. Ansetzen der Eichlösungen.....24
12.1.3. Messung der Eichlösungen und Auswertung...25
12.1.4. Der Eichfaktor.....26
12.1.5. Rechenbeispiel.....26
12.2. Eichkurven für Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol.....29
12.2.1. Ansetzen der Eichlösungen.....29
12.2.2. Auswertung der Eichlösungen.....30
12.2.3. Eichfaktoren.....33
13. Berechnung der Präzision des massenfragmentographischen Verfahrens.....33

D Ergebnisse.....35

1. Allgemeine Angaben zur Auswertung.....35
2. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.36
2.1. Ergebnisse der Auswertung für die einzelnen Alkohole.....36
2.1.1. Äthanol.....36
2.1.2. Propanol.....40
2.1.3. Isobutanol.....42
2.1.4. Butanol.....42
2.1.5. Isoamylalkohol.....43
2.2. Ergebnisse für die Diabetikergruppen.....43
2.2.1. Gesamtgruppe aller Diabetiker.....43
2.2.2. Insulinpflichtige Diabetiker.....44
2.2.3. Oral eingestellte Diabetiker.....44
2.2.4. Diätetisch eingestellte Diabetiker.....45
2.2.5. Juvenile Diabetiker.....45

2.2.6. Übersicht..... 46
2.3. Die Äthanol- und Propanolkonzentration in Verbindung mit anderem Parametern..... 48
2.3.1. Alkoholwerte bei Vorliegen diabetischer Komplikationen..... 48
2.3.2. Alkoholkonzentration im Zusammenhang mit Blutzuckerwerten..... 48
2.3.3. Regressionsprüfungen..... 49

E Zusammenfassung und Diskussion..... 50

F Literaturverzeichnis..... 52

A. Einleitung

Für die Bestimmung leicht flüchtiger niedermolekularer Verbindungen in biologischen Substanzen wie Serum und Urin standen bis vor wenigen Jahren vor allem zwei Verfahren zur Verfügung: die Gaschromatographie und für Äthanol die enzymatische Bestimmung. Den Vorteilen in der klinischen Anwendbarkeit stand, sofern es sich um sehr niedrige Konzentrationen handelte, vor allem die relativ hoch liegende Nachweisgrenze nachteilig gegenüber. Für die Alkoholdehydrogenasemethode darf man sie erfahrungsgemäß auf etwa 50 mg Äthanol/l festlegen. Die Erfassung solcher flüchtiger Substanzen, die endogen in minimalen Mengen vom Organismus synthetisiert werden und bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen von Interesse sind, stößt bei Verwendung dieser herkömmlichen Verfahren schnell an die Grenzen des Möglichen. Die hier relevanten Konzentrationen liegen zum Teil um eine, teilweise auch um bis zu zwei Zehnerpotenzen niedriger, zum Beispiel für Propanol bei 50µg/l.

Neue Möglichkeiten eröffneten sich durch eine kombinierte Anwendung von Gaschromatograph und Massenspektrometer, die Massenfragmentographie, die von Sweeley im Jahre 1966 eingeführt wurde (12). Nach dem Prinzip der Single Ion Detection (SID) kann das Spektrometer auf ein charakteristisches Massenfragment fokussiert werden, womit es als massenspezifischer Detektor des Gaschromatographen dient. Dieser wiederum ermöglicht durch spezifische Retention eine eindeutige Identifikation der Substanz.

Rein gaschromatographische Bestimmungen niederer Alkohole wurden schon in den Jahren 1964 (7) und 1965 (8) durchgeführt, wobei Äthanol bis zu einer Konzentration von 1-2 mg/100 ml nachgewiesen werden konnte.

Eine weitgehende Vereinfachung des Vorgehens bei der rein gaschromatographischen Bestimmung von Serumproben stellt die später eingeführte Direktblutinjektion, versetzt mit einem internen Standard, dar (2). Auch hier lag die Nachweisgrenze ohne Verwendung des MS noch bei ca. 1 mg/100 ml. Die Steigerung der Empfindlichkeit durch die Kombination mit dem Massenspektrometer beträgt also ebenfalls mindestens eine Zehnerpotenz.

In den vergangenen Jahren hat die Massenfragmentographie-Massenspektrometrie Eingang in verschiedene Bereiche der Medizin, klinischen Chemie und Biochemie gefunden (6). So ist es zum Beispiel mittels dieses Verfahrens gelungen, einige auffällige Befunde bezüglich der Urinkonzentrationen an aliphatischen Alkoholen und Ketonkörpern bei Diabetikern aufzudecken (4), wobei man eine Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung vermutet (1). Von den Untersuchern wurden jeweils verschiedene Verfahren zur Anreicherung und Erhöhung der Ausbeute angewandt wie zum Beispiel eine Adsorption der flüchtigen Bestandteile an Tenax GC (13,5) oder eine Extraktion derselben mittels Diäthylather (5,11).

B. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll durch geeignete Verfahren mit den Möglichkeiten der Massenfragmentographie an einem größeren Kollektiv von Patienten geprüft werden, ob im Serum von Diabetikern eindeutige Veränderungen in der Konzentration verschiedener für die Krankheit spezifischer Stoffwechselparameter im Vergleich zu stoffwechselgesunden Probanden zu erkennen sind.

Untersucht wurden die Serumkonzentrationen an Äthanol, n-Propanol, Isobutanol, n-Butanol und Isoamylalkohol. Um ein möglichst genaues Bild zu erhalten, wurden die Probanden je nach Art ihrer Erkrankung einer von vier Untergruppen der diabetischen Stoffwechselstörung zugeordnet. Es wurde folgende Einteilung vorgenommen, die den Anfor-

derungen der Untersuchung am besten Rechnung zu tragen schien:

Gruppe 1: Insulinpflichtige Patienten = alle ohne Insulin nicht mehr behandelbaren Patienten, ohne Berücksichtigung der juvenilen Diabetiker, die eine eigene Gruppe bilden.
Gruppe 2: Diabetiker mit Einstellung durch orale Antidiabetika und ggf. zusätzlich Diät.
Gruppe 3: Rein diätetisch einstellbare Diabetiker.
Gruppe 4: Juvenile Diabetiker, erwartungsgemäß mit besonders labilem Stoffwechsel bei weitgehender Insuffizienz des Inselzellsystems.

Eine fünfte Gruppe wurde aus einer etwa gleichen Anzahl stoffwechselgesunder Probanden gebildet und zum Vergleich ebenso wie diese untersucht.

Daneben wurden zusätzlich zur Bestimmung der gesuchten Alkohole auch andere Untersuchungen durchgeführt wie die Bestimmung des Insulinspiegels am Morgen des jeweiligen Tages postprandial, des C-Peptidspiegels zum gleichen Zeipunkt und des Blutzuckertagesprofiles mit den Werten "nüchtern", "9 Uhr" und "14 Uhr". Aus den Krankenblättern aller Patienten wurden anamnestische Einzelheiten entnommen wie Körpergewicht, Größe, das Vorliegen diabetischer Komplikationen wie

- diabetische Mikro- und Makroangiopathie
- diabetische Nephropathie (Pyelonephritis oder Kimmelstiel-Wilson)
- diabetische Polyneuropathie

und zusätzliche Stoffwechselparameter wie Triglyceridspiegel, Kreatinin- und auch Harnstoffkonzentration im Serum, um einen möglichen Zusammenhang mit diesen Größen aufzudecken, falls vorhanden, und so vielleicht ergänzende Informationen über die bei Diabetes mellitus auftretenden Stoffwechseldeviationen zu gewinnen.

C. Methoden

1. Apparative Ausstattung und Beschreibung der Geräte

1.1. Gaschromatograph

Als Chromatograph wurde das Modell 2700 der Varian MAT GmbH Bremen verwendet, wobei für die Bestimmung des Äthanols einerseits und der höheren Alkohole andererseits verschiedene Trennkapillaren benötigt wurden.

1.1.1. Bestimmung der höheren Alkohole

Die Auftrennung der injizierten Substanzmenge erfolgte hier in einer Stahlkapillarsäule (100 m x 0,5 mm i. D.), belegt mit Emulphor ON-870, welche nur für diesen Zweck Verwendung fand. Die Kopplung des GC mit dem Massenspektrometer fand über eine Platinkapillare (30 cm x 0,1 mm i. D.) statt.

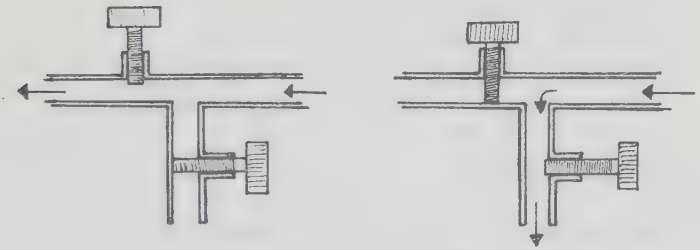
1.1.2. Bestimmung von Äthanol

Die Auftrennung der injizierten Substanzmenge erfolgte ebenfalls durch eine mit Emulphor ON-870 belegte 100 m lange Stahlkapillare von 0,5 mm innerem Durchmesser. Zusätzlich stellte sich hier jedoch das Problem des hohen Wassergehaltes des direkt injizierten Serums, der bei ungehindertem Einstrom in das Massenspektrometer das System unweigerlich beeinträchtigt hätte. Durch eine technische Änderung gelang eine weitgehende Ausblendung des zeitlich erst nach dem Äthanol erscheinenden Wassers: zwischen das Ende der Trennkapillare und die anschließende Platinkapillare wurde ein Verbindungsstück mit zwei Ventilen geschaltet, deren eines zum Zeitpunkt des Erscheinens des Wasserdampfes die Verbindung von der Säule ins Massenspektrometer blockierte, während das

zweite das anflutende auszublendende Gas aus der Säulenkapillare herausleitete. Durch die Möglichkeit einer Bedienung von außerhalb des Ofens und durch möglichst rasche Bedienung konnten Temperaturschwankungen weitgehend vermieden werden (5).

Gegenüber einer denkbaren Dreiwegverbindung hat das verwendete 2-Ventil-System den Vorteil eines geringeren Totvolumens. Auch die Dichtigkeit des verwendeten Systems erwies sich als zufriedenstellend. Abbildung 1 stellt das Funktionsprinzip des Ventilmechanismus vereinfacht dar.

Abbildung 1:



a) freier Durchlauf in das Massenspektrometer

b) Ausblendung bei blockiertem Durchlauf

1.2. Gekoppeltes Gaschromatographie-Massenspektrometrie-system

Als Massenspektrometer wurde der Typ CH 5 der Firma Varian MAT/Bremen verwendet, der, wie oben beschrieben, durch eine Platinkapillare mit der Kapillarsäule des Gaschromatographen verbunden war. Durch die Pumpleistung von 600 l/sec einer angeschlossenen Hochleistungsdiffusionspumpe wurde der gesamte Säulendurchfluß in die Ionenquelle geleitet, wobei als Trägergas in allen

Fällen Helium diente. Der Sekundärelektronenvervielfältiger (SEV) erfüllte bei der Massenfragmentographie die Aufgabe des Detektorsystems.

1.3. Registriergeräte

Die einzelnen Massenfragmentogramme wurden mit einem 2-Kanal-Kompensationsschreiber der Firma Perkin-Elmer, Überlingen, aufgezeichnet. Das Gerät verfügt über eine Nullpunktsanzeige und einen Meßbereichsschalter, der eine Einstellung des Vollausschlages auf 1, 5, 10, 50 und 100 mV sowie 0,2 V, 0,5 V und 1 V ermöglicht.

2. Geräteparameter

2.1. Gaschromatograph

Ofentemperatur	65°C
Injektorblocktemperatur	150°C
Gasdurchfluß	8 ml/ min

2.2. Massenspektrometer

SEV-Spannung	2,75 kV
Beschleumigungsspannung	3 kV
Emissionsstrom d. Ionenquelle	300 µA
Elektronenenergie d. "	70 eV
Ionenquellentemperatur	220°C
Interfacetemperatur	200°C
Auflösung	400
Arbeitsdruck	5×10^{-5} torr
Verstärkereinstellung	BDF 0,02

2.3. Kompensationsschreiber-Einstellung

a) Dämpfung: - bei der Äthanolbestimmung Grundeinstellung 10 mV als Vollausschlag, bei Bedarf Wahl einer anderen Empfindlichkeit.
- bei Bestimmung der höheren Alkohole Grundeinstellung 5 mV als Vollausschlag, ggf. ebenfalls Wahl einer anderen Einstellung.

b) Papiervorschub: 5 mm/min bei allen Bestimmungen.

3. Vorbereitung und Wartung der Geräte

Um die nötige Arbeitstemperatur, die gewünschte Stabilität der Basislinie und den erforderlichen Arbeitsdruck von 5×10^{-5} torr zu erreichen, war meist eine Anlaufzeit von etwa 30 Minuten erforderlich. Danach wurde eine Ätherprobe in die Ionenquelle eingebracht, mit Hilfe derer nach Einstellung der Magnetstromregler auf das zu untersuchende Fragment fokussiert und somit das Signal optimiert werden konnte.

Eine maximale Unabhängigkeit von netzbedingten Schwankungen war bei Erscheinen eines trapezförmigen Signals auf dem Monitor gegeben. Die erhaltene Fokussierung wurde jeweils nach einem halben Versuchstag überprüft und nötigenfalls korrigiert oder gänzlich neu vorgenommen, die Lage der Nullinie des Kompensationsschreibers jeweils nach jedem neu aufgenommenen Fragmentogramm kontrolliert.

Jede zunehmende Verunreinigung des Systems zeigte sich in einem Nachlassen der Auflösung und somit einer Verstärkung des Grundrauschens. In diesem Fall wurden für 12 Stunden, meist über Nacht, die Kapillarsäule, die Ionenquelle oder beide Teile ausgeheizt.

4. Chemikalien

4.1. Standardsubstanzen

4.1.1. Interne Standards

- Äthanolbestimmung: Diäthyläther p.a., Merck 921, mind. 99,5%
- höhere Alkohole: Crotylalkohol p.a., Merck 80654, mind. 97%

4.1.2. Alkoholstandards, für die Erstellung d. Eichkurven

- Äthanol p.a., Merck 972, mind. 99,8%
- Propanol p.a., Merck 998, mind. 99,5%
- Isobutanol p.a., Merck 984, mind. 99%
- Butanol-1 p.a., Merck 1990, mind. 99,5%
- Isoamylalkohol p.a., Merck 979, mind. 99%

4.1.3. Extraktionsmittel

Dichlormethan bidest p.a., Merck 6050, mind. 99,5%, zusätzlich folgendermaßen aufgearbeitet:
1500 ml Dichlormethan werden mit 150 ml konz. Schwefelsäure kräftig geschüttelt und anschließend für einen Tag im Kühlraum aufbewahrt. Danach wird nochmals kräftig geschüttelt und die Schwefelsäure aus dem Schütteltrichter ausgelassen. Das so gereinigte Dichlormethan wird mit 75 ml 1n NaOH und dann noch zweimal mit 100 ml Aqua bidest. gewaschen. Zuletzt erfolgt Filtration und Destillation über Natriumsulfat.

4.1.4. Reinigungsmittel

Aceton p.a., Merck 14, mind. 99,5%

5. Spezifität des Verfahrens und Interferenzen

Zur Erfassung der gesuchten Substanzen wird eine Kombination zwischen zwei Verfahren angewandt: die gaschromatographische Auftrennung und zweitens die Massenspektrometrie, mit deren Hilfe die Intensität der entsprechenden Fragmentionenbildung im Single-Ion-Detection-Prinzip bestimmt wird. Substanzen, die mit der jeweils gesuchten interferieren könnten, müßten die gleiche Retentionszeit bei der gaschromatographischen Auftrennung aufweisen und zusätzlich bei der Massenspektrometrie in der Ionenquelle das gleiche Fragmention abspalten.

Die Bildung des Fragmentions erfolgt bei den primären Alkoholen durch Aufspaltung der der Hydroxylgruppe benachbarten C-C-Bindung:

$$R - CH_2 - CH_2 - OH \longrightarrow (\overset{+}{C}H_2\,\underline{\bar{O}}H - CH_2=\underline{\dot{O}}H^{+}) \quad (10)$$

Das Fragmention der primären Alkohole hat die Masse 31. Weitere Verbindungen, die ebenfalls das Fragmention der Masse 31 bilden können, sind die Ketonkörper Aceton, Butanon, Pentanon, Pentenon, Hexanon, Heptanon 2 und 4. Der 31er Peak dieser Substanzen hat jedoch nur eine Intensität von 1 bis 3 % des Maximalpeaks im jeweiligen Massenspektrum, kann also quantitativ nicht ins Gewicht fallen. Ebenfalls ein Fragmention der Masse 31 findet sich bei Diäthyläther, das in Körperflüssigkeiten so gut wie nicht vorkommt, sowie bei Essigsäuremethylester, hier jedoch wieder nur zu maximal 5 % des höchsten Peaks im Fragmentogramm. Auch letztere Verbindung ist in menschlichen Körperflüssigkeiten fast nie nachweisbar. Da die aufgeführten Substanzen zudem sämtlich andere Retentionszeiten aufweisen als die in dieser Arbeit untersuchten, ist eine Interferenz ausgeschlossen. Das Verfahren kann also als hochspezifisch bezeichnet werden.

6. Interner Standard

6.1. Prinzip

Eine beträchtliche Schwierigkeit stellt bei der massenfragmentographischen Bestimmung flüchtiger Substanzen die Konstanthaltung der Messbedingungen dar. Die Probleme hierbei beginnen schon bei sehr geringen Schwankungen der Temperatur im Injektorblock oder in der Kapillarsäule; hierbei kann schon eine Schwankung von nur 1°C eine feststellbare Änderung des Zeigerausschlags am Kompensationsschreiber bewirken. Trotz sorgfältigen Vorgehens dürften sich solche Schwankungen nicht gänzlich vermeiden lassen.

Ein weiterer Punkt, der gewisse Abweichungen mit sich bringen kann, ist die Einbringung der zu untersuchenden Substanz, in diesem Falle des Serums, in den Injektorblock des Gaschromatographen. Bei allen Messungen wurde jeweils 1 µl Substanz in die Kapillare verbracht, wobei wobei eine 10 µl-Präzisions-Glasspritze verwendet wurde. Eine Ungewißheit liegt hierbei nicht in der jeweils aufgezogenen Menge, sondern weit mehr wird die Höhe des Zeigerausschlages durch die individuelle Technik bei der Injektion selbst bestimmt, da das Massenspektrometer lediglich die injizierte Gesamtmenge bestimmt und je nach Dauer des Einspritzvorganges auch verschiedene Anteile derjenigen Substanzmenge verdampfen, die sich nach Entleerung der Spritze noch in deren Spitze befindet. Verschiedene Untersucher kommen daher am gleichen Gerät häufig auf Unterschiede im Zeigerausschlag von etwa 10 %. Der sicherste Weg, von derartigen Schwankungen unabhängig zu werden, ist daher die Verwendung eines internen Standards, der dem Untersuchungsgut in definierter Konzentration beigegeben wird und somit im gleichen Untersuchungsgang unter exakt den gleichen Bedingungen mitbestimmt wird.

6.2. Erforderliche Kriterien

Eine hierfür verwendbare Substanz muß verschiedene Kriterien erfüllen:
-Sie muß in der Ionenquelle gleiches Verhalten aufweisen wie die zu messende Substanz, in diesem Falle also gleichfalls Fragmente der Masse 31 bilden.
-Sie muß im Untersuchungsmaterial gut löslich sein.
-Sie sollte bezüglich des Dampfdruckes ähnliche Eigenschaften besitzen wie die zu messende Substanz.
-Sie muß in der Trennkapillare eine andere Retentionszeit aufweisen als die zu messende Substanz, denn zwischen den vom Schreiber aufgezeichneten Ausschlägen muß zur klaren Unterscheidung und genauen Messung ein gewisser Mindestabstand gegeben sein.

Durch die Einführung des inneren Standards findet sich neben den Meßpeaks für die Alkohole stets der zugehörige Standardpeak, so daß sich aus dem Verhältnis der beiden Ausschläge unter Zuhilfenahme einer Eichkurve leicht die Konzentration errechnen läßt, ohne daß der Untersucher auf Substanzverluste bei der Einspritzung oder kleinere Temperaturschwankungen Rücksicht nehmen muß.

6.3. Chemische Substanzen

Bei der Bestimmung des Äthanols erwies sich für die Funktion eines innneren Standards Diäthyläther als gut geeignet. Verwendet wurde Diäthyläther p.a. der Firma Merck 921, mind. 99,5%.

Für die Bestimmung des höheren Alkohole wurde verwendet Crotylalkohol p.a., Merck 802654, mind. 97 %, der, um die maximale Reinheit zu erhalten, ständig auf +4°C gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt wurde.

6.4. Ansetzen der Standardlösungen

Es wurden Versuche ausgeführt mit zufällig ausgewählten Serumproben, die mit verschiedenen Konzentrationen des inneren Standards versetzt waren. Ziel dieser Versuche war es, vom Schreiber für den Standard Zeigerausschläge zu erhalten, die bei einer Einstellung der Dämpfung, wie sie den zu erwartenden Alkoholkonzentrationen entsprach, etwa zwei Drittel des maximalen Zeigerausschlages betragen sollten. Dabei ergaben sich für die Konzentrationen der Standards im Serum folgende Größen:

1. Diäthyläther: 2 µl/ml Serum.
   Hierzu wurden 50µl Diäthyläther mit Aqua bidest. in einem Glaskolben mit Schliffverschluß auf 100 ml aufgefüllt. Dies bildete die Standard-Stammlösung, die für jeden Untersuchungsgang neu angesetzt und, wenn nicht mehr benötigt, ebenfalls stets bei +4°C aufbewahrt wurde. Von dieser Äther-Stammlösung wurden dann je 4 µl in 1 ml Serum eingebracht, woraus sich die endgültige Konzentration errechnet.
2. Crotylalkohol: 1 µl/ml Serum.
   Hier wurden 25 ml, wie für Äther beschrieben, auf 100 ml aufgefüllt und davon wiederum 4 µl in 1 ml Serum verbracht. Die Konzentration errechnet sich somit zu 1 µl/ml.

7. Herkunft des Untersuchungsmaterials und Gewinnung der Proben

Den Patienten, die sich zur Verfügung gestellt und sich ausdrücklich bereiterklärt hatten, drei Tage vor bis nach dem Abschluß der Untersuchung keinerlei Alkohol zu sich zu nehmen, wurden morgens zwischen 7^{30} Uhr und 9^{00} Uhr ca. 10 ml Venenblut abgenommen. Die Blutröhrchen wurden sofort nach Retraktion des Gerinnsels für 15 min zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert. Meist gelang es auf diese Weise, etwa 5 ml Serum zu gewinnen, von denen jeweils

1/2 ml für die radioimmunologischen Bestimmungen des Insulins und des C-Peptids, 2 ml für die Bestimmung des Serumäthanols und 2 ml für die der höheren Alkohole getrennt in Kunststoffröhrchen abgefüllt und verschlossen wurden. Die Verarbeitung des Venenblutes erfolgte so rasch wie möglich, um eine Verminderung des Alkoholgehaltes durch Abdampfen bzw. durch enzymatischen Abbau zu vermeiden.

Aus organisatorischen Gründen war eine solche sofortige Untersuchung der Proben nur im kleineren Teil der Fälle möglich, so daß häufig eine Zwischenlagerung nicht zu umgehen war. Diese erfolgte tiefgefroren bei - 18°C, ging jedoch über eine Dauer von 4-6 Wochen nicht hinaus. Untersuchungen über die Veränderung des Alkoholgehaltes länger gelagerter Blutproben, 1972 von H.-J. Mittmeyer (9) an Rinderblutproben durchgeführt, ergaben keinen nennenswerten Abfall der Konzentration selbst über Monate hinaus bei einer Lagerung im gefrorenen Zustand. Es schien somit erlaubt, auch in der Auswertung auf eine Unterscheidung zwischen sofort bestimmten und zwischengelagerten Proben zu verzichten.

8. Aufbereitung der Proben für das Analyseverfahren

Für die Bestimmung des Äthanolkonzentration erwies sich die Direktblutinjektion von Serum, versetzt mit internem Standard, als die Methode der Wahl. Sie wird bereits seit Jahren mit gutem Erfolg in der Gaschromatographie angewandt und erfordert im Vergleich mit der Kopfraumanalyse oder dem Extraktionsverfahren keinen nennenswerten Aufwand. Der Nachteil einer Verunreinigung mit Serumbestandteilen in Injektorblock, Säule und verwendeter Spritze wiegt dagegen gering und ist bei sauberem Arbeiten sowie regelmäßiger Wartung leicht hintanzuhalten.

Sowohl bei der Äthanolbestimmung wie auch bei der in

einem zweiten Arbeitsgang erfolgten Bestimmung der höheren Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol wurde 1 ml Serum in ein Schliffglas pipettiert und mittels einer 10-Mikroliter-Spritze mit 4 µl des jeweiligen internen Standards versetzt, danach verschlossen und zwei Minuten lang intensiv geschüttelt. Der Standard wurde, solange er nicht benötigt wurde, im Kühlschrank auf +4°C gekühlt aufbewahrt. Die weiteren Arbeitsgänge nun differierten:

1. Äthanolbestimmung: Die 1 ml-Serumprobe war nach Hinzufügung des Standards für die Direktinjektion bereit. Diese erfolgte ohne Verzug, um jedem Abdampfen des internen Standards zuvorzukommen.
2. Bestimmung der höheren Alkohole: Da hier die Serumkonzentration wesentlich niedriger lag als die des Äthanols, wurde es notwendig, ein Verfahren zur Anreicherung der zu bestimmenden Substanzen in der Probe anzuwenden. Aus diesem Grunde wurden zunächst die Alkohole aus dem Serum extrahiert. Hierzu wurde die mit dem Standard versetzte Menge von 1 ml Serum im gleichen Schliffglas mit genau 1 ml Dichlormethan p.a., Merck 6050, das eine Zusatzbehandlung, wie in Abschnitt 4.1.3. beschrieben, erfahren hatte, überschichtet. Sodann wurde das Glas durch den Schliffdeckel wieder verschlossen und zwei Minuten lang kräftig geschüttelt. Um wieder sauber getrennte Phasen zu erhalten, wurden die Gläser dann für 5 min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde sodann zum Großteil mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Dichlormethanphase vorsichtig in ein 1 ml-Nisslröhrchen abgegossen. Die so erhaltene Menge von 1 ml Dichlormethan, hierin gelöst nunmehr die gesuchten Alkohole mitsamt dem internen Standard, durch gleiche physikalische Eigenschaften im gleichen Konzentrationsverhältnis wie zuvor im Serum, wurde zuletzt durch Überströmen mit Stickstoff auf 1/10 ihres Ausgangsvolumens, meist also zwischen 80 und100 µl, eingeengt. In der resultierenden Dichlormethanlösung lagen also alle Bestand-

teile in gegenüber der Ausgangslösung zehnfach konzentrierter Form vor. Das Abdampfen selbst dauerte jeweils etwa 5 min und konnte bei guter Zeiteinteilung parallel mit der Registrierung der Fragmentogramme erfolgen.

Die Genauigkeit des Verfahrens ist hoch anzusetzen, da Verluste wie auch Konzentrierung die zu untersuchenden Alkohole und den Standard gleichermaßen betreffen.

Die Ausbeute stieg erfahrungsgemäß mit der Dauer des Schüttelns, erreichte aber bereits nach 2 min ein Optimum, so daß längeres Schütteln die Ausbeute nicht mehr deutlich erhöhen konnte.

Von der am Ende zurückbleibenden Dichlormethanlösung wurde dann wiederum 1 µl mit einer 10-µl-Präzisionsspritze direkt in den Gaschromatographen injiziert, wie oben beschrieben direkt nach Aufbereitung der Probe.

9. Durchführung der Analyse

Nach der Einspritzung, die möglichst gleichmäßig und rasch erfolgte, wurde sogleich die verwendete Spritze gründlich mit Aceton gereinigt (siehe 4.1.4.), um Verunreinigungen zu beseitigen. Einer Verstopfung durch Eiweißbestandteile des Serums, die bei der Direktinjektion des Serums sonst nach kurzer Zeit eintreten würde, mußte durch sofortiges intensives und mehrmaliges Spülen mit Aqua bidest. vorgebeugt werden. Hingegen bei der Bestimmung der höheren Alkohole bestand diese Gefahr nicht, weshalb die Reinigung auf die Acetonspülung beschränkt bleiben konnte.

Die Laufzeiten der Chromatogramme betrugen für die Äthanolbestimmung ca. 5 min, gerechnet vom Zeitpunkt des Einspritzens. Danach wurde für etwa 10 min mit dem unter 1.1.2. beschriebenen T-Ventilsystem das nachfolgende Wasser ausgeblendet. Eine gesamte Äthanolbestimmung dauerte demnach mindestens 15 Minuten.

Bei der Bestimmung der höheren Alkohole vergingen etwa 15 Minuten von der Einspritzung bis zum Erscheinen des letzten zu registrierenden Ausschlags. Hier konnte jedoch das Verfahren verkürzt werden durch überlappende Chromatographie: ohne Beeinträchtigung der gerade laufenden Bestimmung konnte die nächste Probe bereits kurz vor Erscheinen des Standardpeaks , ca. vier Minuten vor Ende des vorhergehenden Chromatogrammes, eingespritzt werden, denn ein Ausblenden wie bei der Äthanolbestimmung war hier nicht nötig. Die einzelnen Bestimmungen dauerten also bei völlig reibungslosem Ablauf etwa 11-12 Minuten.

In dieser Zeit erfolgte die Registrierung mit dem Kompensationsschreiber. Dabei mußte je nach gemessener Konzentration die Dämpfung des Gerätes nötigenfalls variiert und dies auf dem Chromatogramm vermerkt werden. Eine ständige genaue Kontrolle der Registrierung war also erforderlich. Nach jeder Probe wurde die Lage der Nullinie mit Hilfe der Kontrolltaste überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

10. Beschreibung der Chromatogramme

10.1. Höhere Alkohole

Um die Chromatogramme auswerten zu können, mußten zuerst die Retentionszeiten der einzelnen Alkohole bestimmt werden. Dazu wurde vorab eine Leerwertbestimmung aus 1 ml Aqua bidest., versetzt mit 4 µl der angesetzten Crotylalkoholstandardlösung, vorgenommen, um eine Beeinflussung durch Verunreinigung auszuschließen. Zugleich war es möglich, durch genaue Markierung des Zeitpunktes der Einspritzung die Retentionszeit der Standardsubstanz zu bestimmen. In weiteren Arbeitsgängen wurde jeweils wieder 1 ml Aqua bidest. mit Standard in üblicher Konzentration und zusätzlich Propanol, im dritten Arbeitsgang Isobutanol und so weiter in gleicher Konzentration wie der Standard versetzt und bestimmt.

So wurden für alle Alkohole einzeln die Retentionszeit, der zeitliche Abstand zum Standardpeak und die Relation der Zeitabstände ermittelt, so daß eine Identifikation stets sicher möglich wurde. Die Meßausschläge der Alkohole erschienen dann an einem Versuchstag beispielsweise in einer zeitlichen Abfolge wie dieser:

1. Propanol: 6 1/2 min nach der Einspritzung
2. Isobutanol: 8 1/2 min nach der Einspritzung
3. Butanol: 11 min nach der Einspritzung
4. Crotylalkohol: 14 min nach der Einspritzung
5. Isoamylalkoh.: gleich anschließend an den Standard, 15 min nach der Einspritzung.

Abbildung 2 auf der folgenden Seite zeigt anhand eines Originalchromatogrammes das Erscheinen der verschiedenen Peaks in der oben geschilderten Reihenfolge.

10.2. Äthanol

Das Vorgehen war das gleiche, wie unter 10.1. beschrieben, nur waren in diesem Falle lediglich zwei Arbeitsgänge erforderlich. Es zeigte sich, daß die Retentionszeit des Äthanols etwa eine Minute länger war als die des Diäthyläther-standards, so daß zuerst der Standardpeak, anschließend der Äthanolpeak registriert wurde. In Abbildung 3 sind Chromatogramme aus der Reihe der Äthanolbestimmungen wiedergegeben. Der Abfall der Nulllinie resultiert aus der anschließenden Ausblendung des anflutenden Wasserdampfes, die mit einem Abschluß des Massenspektrometers gegen den Gaschromatographen verbunden war.

Abbildung 2:
Chromatogramm der Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol

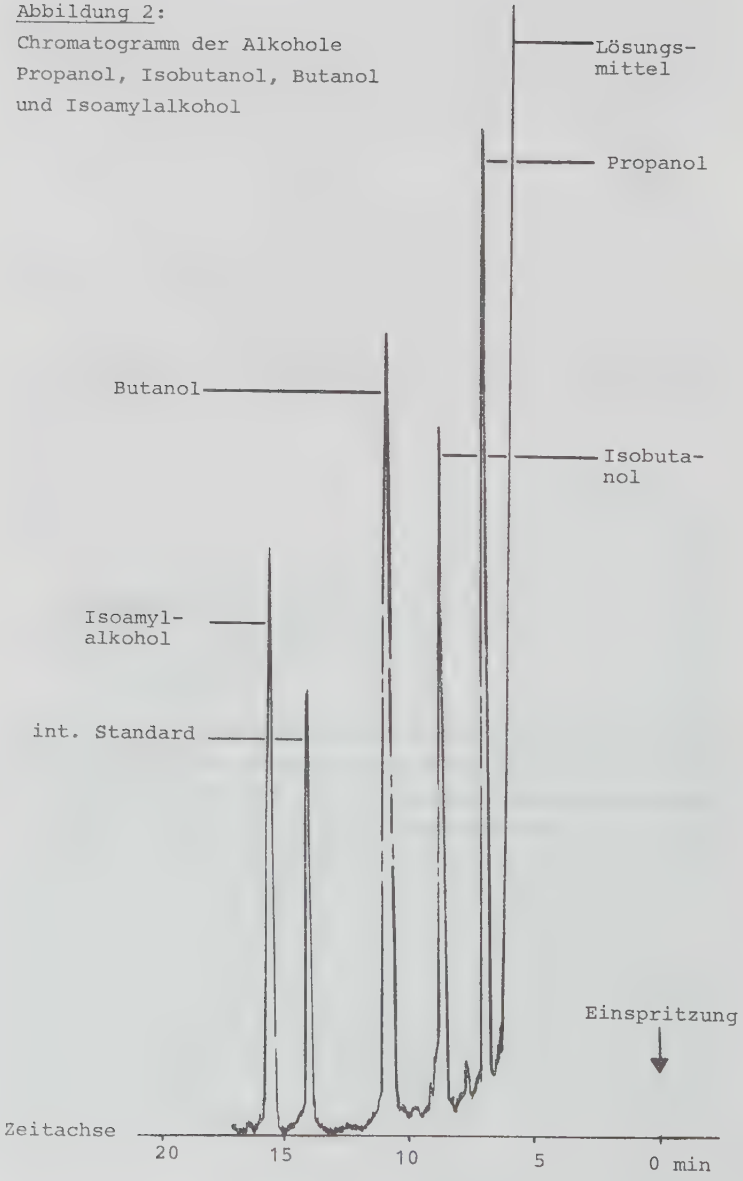
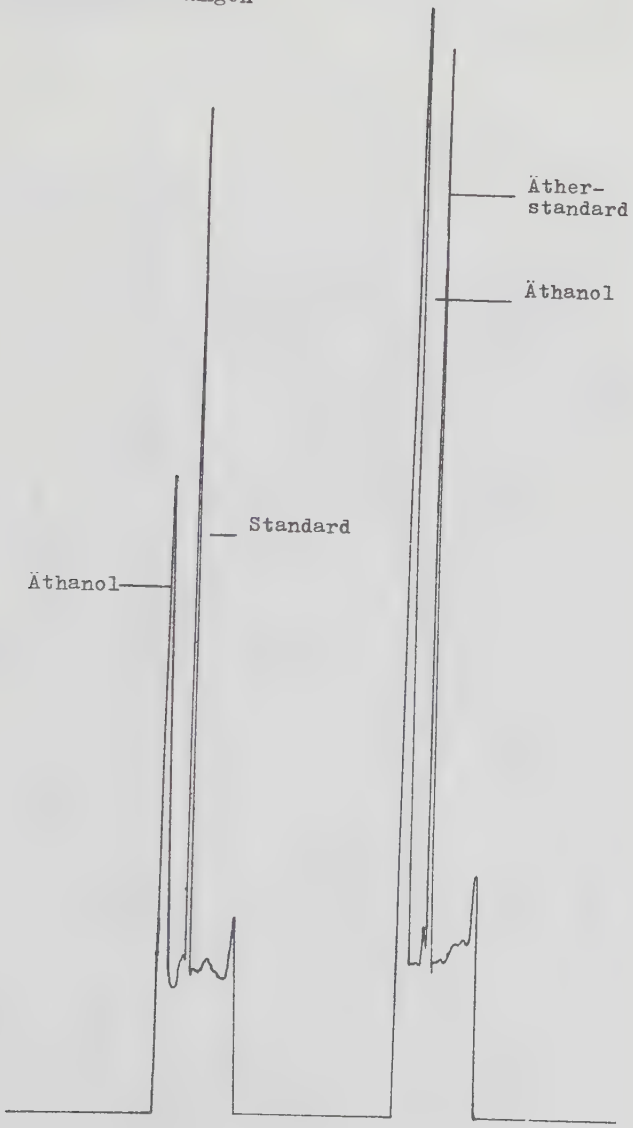


Abbildung 3

Zwei Chromatogramme aus der Reihe der Äthanolbestimmungen



11. Auswertung

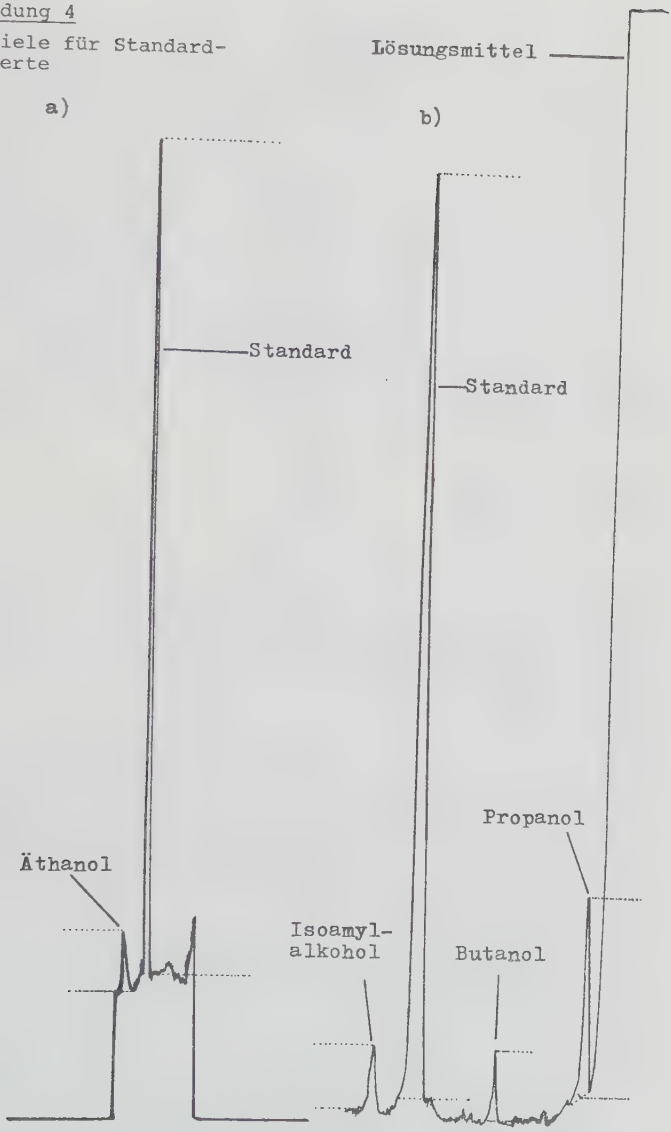
11.1. Standardleerwert

Im Laufe eines jeden Versuchstages wurde, um mögliche Verunreinigungen des Standards zu eliminieren, eine Standardleerwertbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 4 µl Standard-Ausgangslösung (siehe Abschnitt 6) in einem Schliffglas mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt und von dieser Lösung wie üblich 1 µl in den Injektorblock eingespritzt. Die dabei registrierten Ausschläge wurden gemessen und, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, aus ihnen rechnerisch der Alkoholgehalt des verwendeten internen Standards ermittelt, sofern er einen solchen aufwies. Dieser Wert wurde als Konstante von allen am selben Versuchstage ermittelten Alkoholkonzentrationen abgezogen, um den unverfälschten Wert zu erhalten.

Die Abbildung vier der folgenden Seite zeigt Beispiele solcher Standard-Leerwerte jeweils für Diäthyläther und Crotylalkohol.

Abbildung 4

Beispiele für Standard-leerwerte



11.2. Quotientenermittlung

Die gestrichelten Linien in Abbildung 4 bezeichnen Basislinien und Maxima der registrierten Ausschläge. Diese dienen zur Ausmessung der Höhen, die mit einer Genauigkeit von 1,0 mm vorgenommen wurde. Eine noch größere Genauigkeit anzustreben, verbot sich durch das stets in gewissem Umfange vorhandene Grundrauschen, die Unruhe der Grundlinien.

Aus den gemessenen Werten wurde für jeden Alkohol einzeln der Quotient der Meßhöhen in mm Alkohol/Standard gebildet. Im Falle der Leerwerte von Abbildung 4 ergaben sich somit

a) für Äthanol: 0,07
b) für Propanol: 0,22
c) für Butanol: 0,07
d) für Isoamylalkohol: 0,07

als Korrekturfaktoren. Bei der Errechnung der Isobutanolkonzantration war die Korrektur der Quotienten in diesem Falle nicht nötig, da der Standard keinen erkennbaren Isobutanolpeak zeigt.

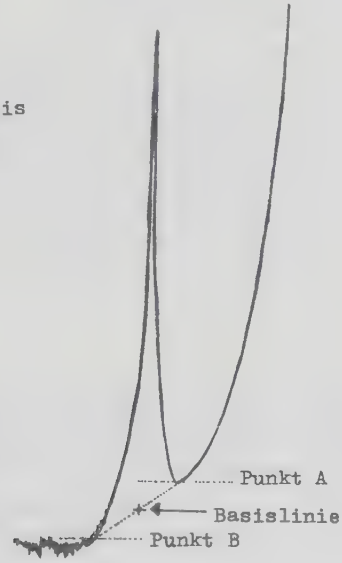
Da besonders bei der Propanolbestimmung mitunter Flanken-Peaks auftraten, mußte hier für die genaue Ermittlung der Höhe der Ausschläge die Basislinie gesondert ermittelt werden: in diesem Falle wurde zwischen dem Punkt, an dem der Zeiger zu Beginn des Ausschlages die Basislinie verließ (Punkt A in Abb. 5), und dem Punkt, an dem er sie am Ende des Peaks wieder erreichte (Punkt B in Abb. 5), eine Verbindungslinie gezogen, deren Mitte als Basis des Peaks anzusehen war. Abbildung 5 verdeutlicht das Vorgehen.

In der beschriebenen Weise wurde bei der Auswertung aller Chromatogramme vorgegangen, wobei von den errechneten Quotienten jeweils der dazugehörige Quotient des Standard-Leerwertes des betreffenden Tages abgezogen

wurde. Die Konzentrationen selbst konnten mittels der für die einzelnen Alkhole gesondert erstellten Eichkurven graphisch sowie rechnerisch ermittelt werden.

Abbildung 5

Ermittlung der Basis von Flankenpeaks, maßstablich stark vergrößert.



12. Erstellung der Eichkurven

12.1. Äthanol-Eichkurve

12.1.1. Feststellung der Nachweisgrenze

Um auch niedrigste Äthanolkonzentrationen sicher bestimmen zu können, war es notwendig, in die Eichkurve auch einen Wert eingehen zu lassen, der sich im Bereich der minimalen nachweisbaren Konzentrationen bewegen sollte. Daher wurden in Reihenfolge sinkender Konzentrationen verschiedene sehr gering konzentrierte Äthanollösungen, versetzt mit Standard, gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß die geringste sicher nachweisbare Äthanolmenge um 0,16 µg bei Injektion von 1 µl Substanz liegt, also einer

Konzentration von 0,16 mg/l, welche daher für Eichlösung Nr. 1 zugrundegelegt wurde.

12.1.2. Ansetzen der Eichlösungen

Zunächst erfolgte die Herstellung eine Äthanolstammlösung: 50 µl Äthanol p.a. wurden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. Davon ausgehend wurden sechs verschieden konzentrierte Eichlösungen angefertigt, indem der Stammlösung verschiedene Volumina entnommen und in verschließbaren Glaskolben mit Aqua bidest. auf 25 ml aufgefüllt wurden. Die genauen Volumina sowie die entsprechenden Konzentrationen der Eichlösungen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1

Eichlösung Nr.	µl Stammlösung in 25 ml	Konzentration der Eichlösung in mg/l
1	10 µl	0,158
2	50 µl	0,79
3	100 µl	0,158
4	500 µl	7,9
5	2000 µl	31,6
6	5000 µl	79

Die Umrechnung der Konzentrationsangaben erfolgte unter Berücksichtigung der Dichte des Äthanols (0,79).

12.1.3. Messung der Eichlösungen und Auswertung

Jeder Eichlösung wurde 1 ml entnommen und mit 4 µl Ätherstandard, wie in Abschnitt 6.4. beschrieben, versetzt. Von diesen Proben der Eichlösungen 1,2,5 und 6 wurden je dreimal 1 µl entnommen, eingespritzt und einzeln ausgewertet. Die Eichlösungen 3 und 4 wurden fünfmal bestimmt, da anhand dieser Werte zugleich eine Präzisionsbestimmung des Verfahrens durchgeführt wurde (siehe Abschn. 13). Die gemessenen Quotienten, wiederum nach Abzug des Standardleerwertes vom Versuchstage, sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2

Lösg. Nr.	Quotient a	b	c	d	e	Mittelwert $\bar{x}$
1	0,043	0,044	0,042	-	-	0,043
2	0,19	0,15	0,18	-	-	0,17
3	0,40	0,376	0,36	0,32	0,38	0,367
4	1,820	1,796	1,688	1,653	1,710	1,73
5	7,3	8,2	7,3	-	-	7,6
6	18,7	18,1	17,2	-	-	18,0

12.1.4. Der Eichfaktor

Aus den gemessenen Quotienten wurde die in Abb. 7 dargestellte Regressionsgerade zeichnerisch wie auch rechnerisch ermittelt. Um aus den einzelnen Quotienten der Chromatogramme ohne großen Aufwand die entsprechenden Äthanolkonzentrationen ermitteln zu können, empfahl es sich, aus der Eichkurve einen Eichfaktor zu ermitteln, der sich als Quotient aus $\frac{\text{Äthanolkonzentration (Abszisse)}}{\text{ermittelter Quotient (Ordinate)}}$ definieren läßt.

Durch einfache Multiplikation des Quotienten Q der registrierten Peaks (Äthanol/Äther) mit dem Eichfaktor f war die zugehörige Konzentration K zu finden:

$$K = Q \cdot f \text{ (mg/l)}$$

Der Eichfaktor errechnete sich als

$$f = 4{,}3 \text{ mg/l}$$

12.1.5. Rechenbeispiel

Der Rechnung liegt das Chromatogramm zugrunde, das zusammen mit dem zugehörigen Standard-Leerwert desselben Tages in Abb. 6 dargestellt ist.

Der Quotient aus dem Standard-Leerwert beträgt 0,08
Die Probe selbst ergibt einen Quotienten von 0,89
Der wahre Wert nach Abzug der Konstanten ist 0,81
Nach Multiplikation mit dem Eichfaktor f ergibt sich eine Konzentration von 3,48 mg Äthanol/l im untersuchten Serum.

Bei der großen Anzahl der insgesamt durchzuführenden Berechnungen erwies sich, daß die Verwendung eines solchen Eichfaktors nicht nur erheblich zeitsparender, sondern auch genauer war als die graphische Ermittlung direkt aus der Eichkurve. Das Prinzip wurde daher auch für die Auswertung der Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol übernommen.

Abbildung 6
Erläuterung zum Rechenbeispiel

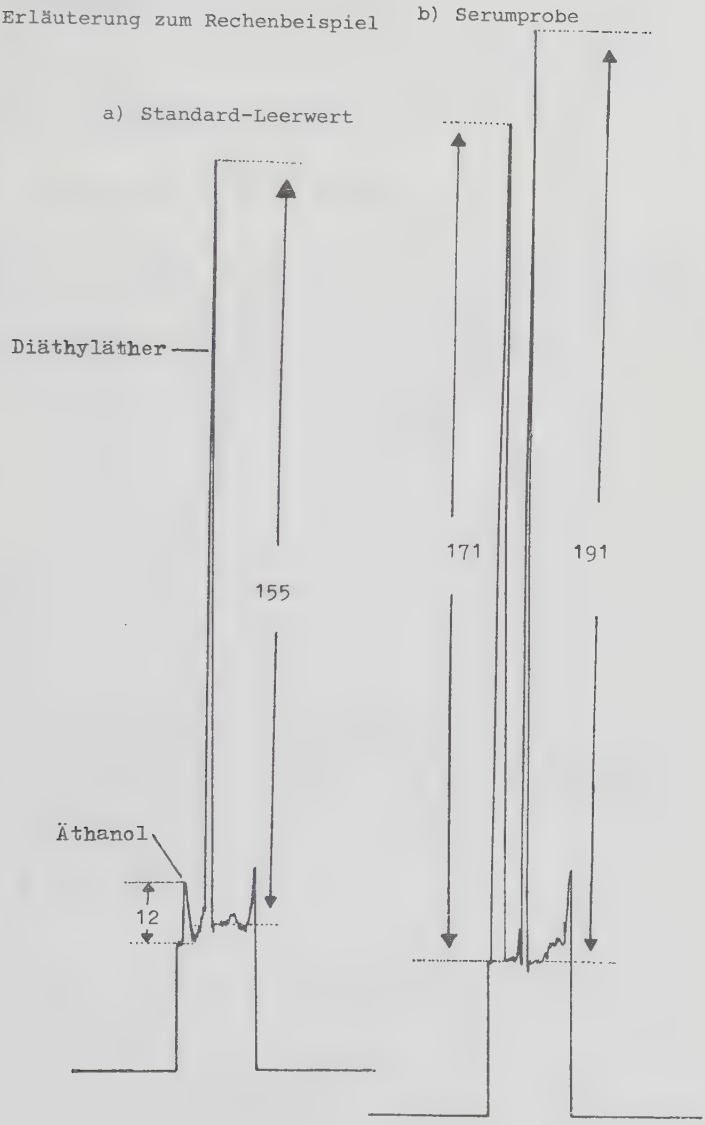
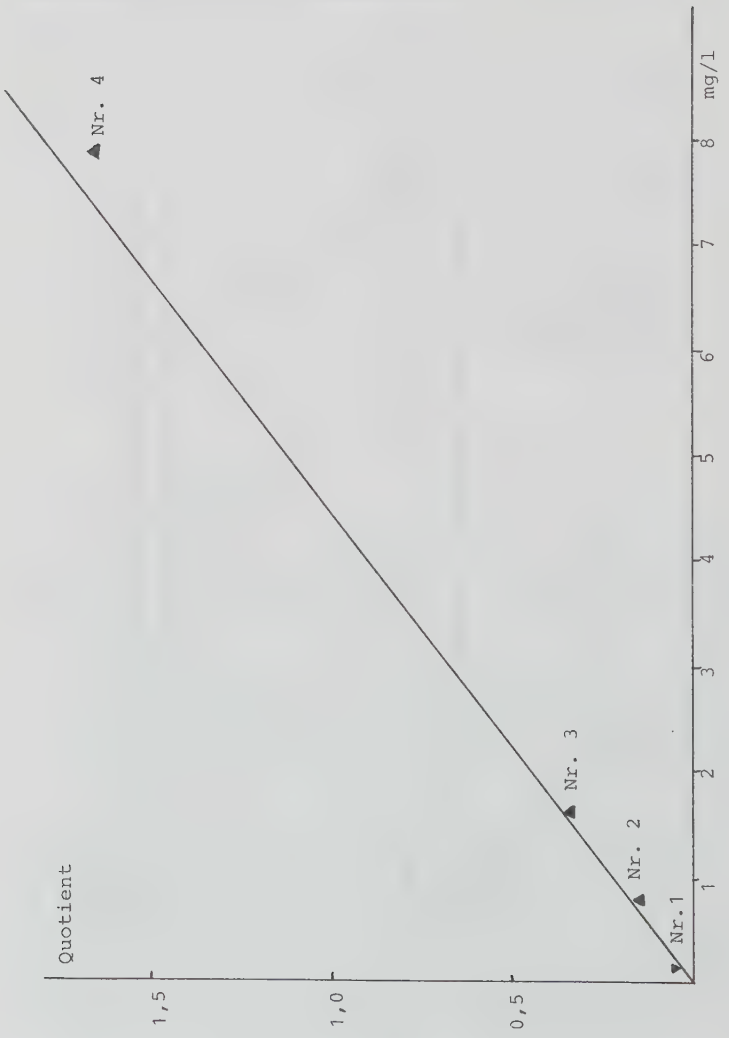


Abbildung 7: Äthanol-Eichkurve



12.2. Eichkurven für Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol

Entsprechend dem Vorgehen bei der Bestimmung dieser Alkohole im Serum konnte auch die Erstellung der Eichkurven in einem Arbeitsgang durchgeführt werden.

12.2.1. Ansetzen der Eichlösungen

Wie üblich wurde der interne Standard mit 25µl Crotylalkohol /100 ml Aqua bidest angesetzt. Dann folgte die Herstellung einer Stammlösung Nr. 1, von der aus mittels eiber Verdünnungsreihe weitere vier Stammlösungen mit geringerer KOnzentration entstanden.
Stammlösung 1 wurde wie folgt angesetzt:

Propanol	10 µl/100 ml Aqua bidest.
Isobutanol	10 µl/100 ml Aqua bidest.
Butanol	4 µl/100 ml Aqua bidest.
Isoamylalkohol	10 µl/100 ml Aqua bidest.

Danach wurde Stammlösung 2 aus Lösung 1 durch Verdünnung derselben im Verhältnis 3:4, Nr. 3 durch Verdünnung von Lösung 1 auf 1:2, Nr. 4 auf 1:4 und Nr. 5 durch Verdünnung auf 1:8 hergestellt. Aus diesen Stammlösungen entstanden die eigentlichen Eichlösungen durch Entnahme von jeweils 4 µl aus den Stammlösungen, die zusammen mit 4 µl internem Standard mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt wurden. Von diesen Eichlösungen wurde je 1 µl massenfragmentographisch bestimmt.

Tabelle 3 zeigt die Konzentrationen der 4 Alkohole in den Eichlösungen 1 bis 5.

Tabelle 3 : Konzentrationen der Eichlösungen

Eichlösung Nr.	Propanol	Isobutanol	Butanol	Isoamyl-alkohol
1	0,32 mg/l	0,32 mg/l	0,13 mg/l	0,324 mg/l
2	0,24 mg/l	0,24 mg/l	0,098 mg/l	0,243 mg/l
3	0,16 mg/l	0,16 mg/l	0,065 mg/l	0,162 mg/l
4	0,08 mg/l	0,08 mg/l	0,033 mg/l	0,081 mg/l
5	0,04 mg/l	0,04 mg/l	0,016 mg/l	0,0405 mg/l

12.2.2. Auswertung der Eichlösungen

Von jeder Eichlösung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, die Quotienten ermittelt und deren Mittelwerte berechnet. Dabei ergaben sich folgende Zahlenwerte:

Tabelle 4 : Propanolbestimmung

	Eichlösung 1	Eichlösung 2	Eichlösung 3	Eichlösung 4	Eichlösung 5
Wert 1	3,45	2,96	1,8	1,01	0,49
Wert 2	4,15	2,92	2,05	0,7	0,6
Mittelwert $\bar{x}$	3,8	2,94	1,925	0,855	0,545

Tabelle 5 : Isobutanolbestimmung

	Eichlösung 1	Eichlösung 2	Eichlösung 3	Eichlösung 4	Eichlösung 5
Wert 1	1,9	1,5	0,98	0,6	0,28
Wert 2	1,7	1,35	0,9	0,38	0,23
Mittelwert $\bar{x}$	1,8	1,425	0,94	0,49	0,255

Tabelle 6 : Butanolbestimmung

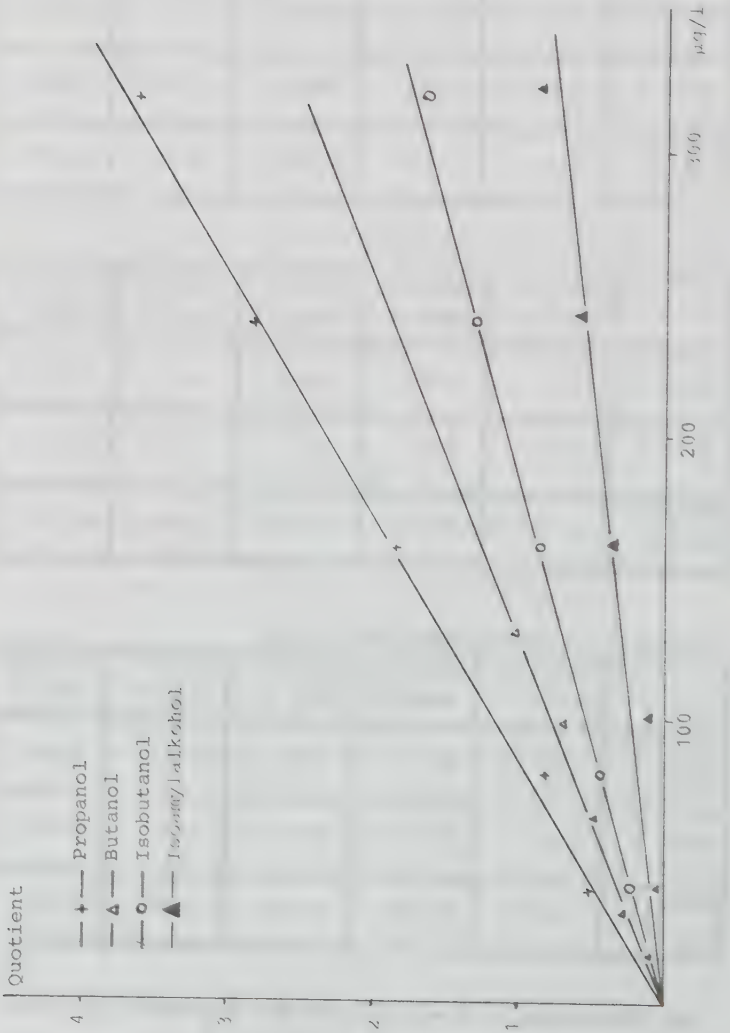
	Eichlösung 1	Eichlösung 2	Eichlösung 3	Eichlösung 4	Eichlösung 5
Wert 1	1,1	0,74	0,54	0,4	0,15
Wert 2	1,16	0,8	0,53	0,23	0,12
Mittelwert $\bar{x}$	1.13	0,77	0,535	0,315	0,135

Tabelle 7 : Isoamylalkoholbestimmung

	Eichlösung 1	Eichlösung 2	Eichlösung 3	Eichlösung 4	Eichlösung 5
Wert 1	1,1	0,7	0,5	0,2	0,13
Wert 2	1,0	0,79	0,43	0,18	0,073
Mittelwert $\bar{x}$	1,05	0,745	0,465	0,19	0,102

Die Eichkurven sind aus Gründen der Übersicht auf einer Darstellung zusammengefaßt (Abbildung 8).

Abbildung 8: Eichkurven der höheren Alkohole



12.2.3. Eichfaktoren

Die Ermittlung der Konzentration aus den Quotienten erfolgte wiederum unter Verwendung von Eichfaktoren, die sich, wie unter 12.1.4. beschrieben, aus der Regressionsgeraden berechnen ließen. Da die Konzentrationen um ein Vielfaches tiefer lagen als die des Äthanols, erschien es ratsam, im Falle der anderen Alkohole die Angaben über die Konzentrationen in µg/l zu machen. Die Errechnung der Propanol-, Butanol-, Isobutanol- und Isoamylalkoholkonzentrationen erfolgte analog 12.1.5.

Die Eichfaktoren waren für

- Propanol: f = 83 µg/l
- Isobutanol: f = 163 µg/l
- Butanol: f = 120 µg/l
- Isoamylalkohol: f = 320 µg/l

13. Berechnung der Präzision des massenfragmentographischen Verfahrens

Die Präzisionsbestimmung wurde im Rahmen der Erstellung der Äthanoleichkurve (12.1.3.) durch fünffache Einspritzung und Berechnung der Eichlösungen 3 und 4 durchgeführt. Die Lösungen wurden aus der Äthanol-Stammlösung jeweils einmal gesondert hergestellt und einzeln mit dem internen Standard versehen.

a) Eichlösung Nr. 3:

Die Messung der registrierten Meßausschläge ergab für die Quotienten Äthanolpeak/ Standardpeak folgende Zahlenwerte:

1. Messung 0,4
2. Messung 0,376
3. Messung 0,36 bei einer Messgenauigkeit
4. Messung 0,32 von 1 mm
5. Messung 0,38

Es ergibt sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 0,3672$.
Hieraus folgt eine Standardabweichung 0,0298.

Der Variationskoeffizient als prozentualer Anteil der Standardabweichung am Mittelwert beträgt demnach

VK = 8,115%.

b) Eichlösung Nr. 4:

Die Messung der Peaks ergab folgende Quotienten:

1. Messung 1,82
2. Messung 1,796
3. Messung 1,688 bei einer Meßgenauigkeit
4. Messung 1,653 von 1mm
5. Messung 1,71

Es ergibt sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 1,73$.

Hieraus folgt eine Standardabweichung von 0,07.

Der Variationskoeffizient beträgt demnach

VK = 4,11 %.

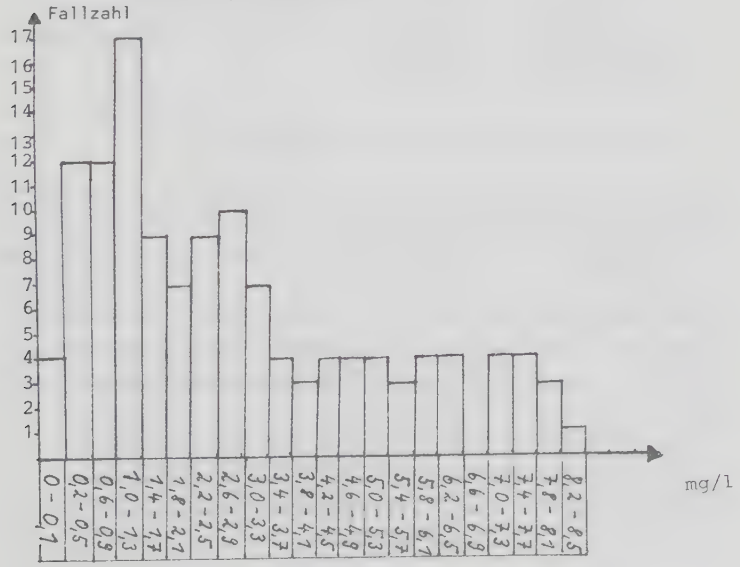
Bei beiden untersuchten Konzentrationen liegt also der Variationskoeffizient unter 10 %, bei Lösung 4 sogar unter 5 %, womit also hinsichtlich der Präzision dem massenfragmentographischen Teil der Untersuchung eine gute Eignung zugesprochen werden darf.

E. Ergebnisse

1. Allgemeine Angaben zur Auswertung

Im Verlaufe der Untersuchungen wurden die Alkoholkonzentrationen in insgesamt ca. 480 Serumproben von 120 Probanden bestimmt, was eine Summe von etwa 1200 schließlich in die Auswertung eingehenden gemessenen Konzentrationen ergab. Die Auswertung selbst erfolgte dabei mittels elektronischer Datenverarbeitung, zunächst durch Darstellung sämtlicher Verteilungen der einzelnen Alkohole innerhalb der verschiedenen Prüfgruppen sowie aller Gruppen gemeinsam. Ein Beispiel für eine solche Verteilung zeigt Abb. 9 .

Abb. 9 : Verteilung der Äthanolkonzentrationen aller Diabetiker, Ausschnitt.



Mit den Meßwerten wurde anschließend der Ausreißertest nach Nalimov (3) durchgeführt, um weitergehende statistische Berechnungen wie den t-Test zur Beurteilung und zum Vergleich von Mittelwerten vornehmen zu können. Im Nalimov-Ausreißertest wird für einen ausreißerverdächtigen Wert x^* der Wert r^* anhand folgender Formel berechnet

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

und mit den entsprechenden Werten r(99) aus der r-Tabelle verglichen. In dem Falle, daß $r^* \geq r(99)$, handelte es sich beim Wert x^* mit einer statistischen Sicherheit von 99% um einen Ausreißer, der eliminiert wurde und in die Berechnungen keinen Eingang fand.

Nachdem so ein orientierender Überblick über die einzelnen Untersuchungsergebnisse möglich war, erfolgte die detaillierte Auswertung durch Berechnung der verschiedenen statistischen Parameter. In den folgenden Abschnitten sind, jeweils aufgegliedert nach Diabetikergruppen und Art des bestimmten Alkohols, die einzelnen Meßergebnisse aufgeführt und interpretiert.

2. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

2.1. Ergebnisse der Auswertung für die einzelnen Alkohole

2.1.1. Äthanol

Die gemessenen Ergebnisse streuten zwischen 158 mg/l und 0 mg/l, wobei exzessiv hohe Werte, die trotz aller Vorsichtsmaßregeln auf den Einfluß exogenen Alkohols zurückzuführen sein könnten, durch den Ausreißertest sicher eliminiert wurden. Proben, bei denen sich schon durch Befund oder Nachforschung dieser Verdacht aufgedrängt hatte, waren schon vor ihrer Bestimmung entfernt und von der Untersuchung ausgeschlossen worden.

Tabelle 8 zeigt die bereinigten Mittelwerte $\bar{x}$ sowie den Stichprobenumfang n und die Standardabweichung s für die Gruppe der Nichtdiabetiker, die 4 einzelnen Diabetikergruppen und das gesamte Diabetikerkollektiv, in einer Gruppe zusammengefaßt. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte hier wie auch in allen anderen Fällen nach der Formel.

$$s = \frac{\text{Summe } (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{mit n als Stichprobenumfang (3).}$$

Tabelle 8 : Äthanolwerte

	n	$(mg/l)^{\bar{x}}$	s
Nicht-diabetiker	29	1,4965	0,9092709
alle Diabetiker	134	3,116	2,535
Insulin-pflichtige	44	4,5886	3,85409
oral Eingest.	37	2,0324	1,6816
diätet. Eingest.	42	4,0452	2,8224024
juvenile Diabetiker	24	9,487	11,561

Die Tabelle zeigt deutliche Unterschiede in den Mittelwerten $\bar{x}$. Um die statistische Sicherheit dieser Unterschiede zu prüfen, wurden die Mittelwerte einem t-Test zum Vergleich von Mittelwerten ( ) unterzogen und anschließend die Beurteilung entsprechend der Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. der statistischen Sicherheit vorgenommen.

Statistische Sicherheit p = 95 % wahrscheinlich
Statistische Sicherheit p = 99 % signifikant
Statistische Sicherheit p = 99,9 % hoch signifikant.

Die Berechnung der zusammengefaßten statistischen Kenngröße τ erfolgte nach

$$\tau = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} \cdot \frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2} \qquad (3)$$

$$\text{mit } s_d = \frac{(n_1-1) \cdot s_1^2 + (n_2-1) \cdot s_2^2}{n_1+n_2-2} \qquad (3)$$

Verglichen wurden die Mittelwerte der einzelnen Diabetikergruppen und der Gruppe aller Diabetiker gemeinsam mit dem Mittelwert der Nichtdiabetiker-Gruppe.

a) Vergleich der Nichtdiabetiker mit dem Sammelkollektiv aller Diabetiker: $\tau = 3{,}3867$
Der Unterschied der Mittelwerte $\bar{x}$ ist mit einer statistischen Sicherheit von 99 % signifikant.

b) Nichtdiabetiker gegen Insulinpflichtige:
$\tau = 4{,}2340$
Es besteht ein mit 99,9 % hoch signifikanter Unterschied.

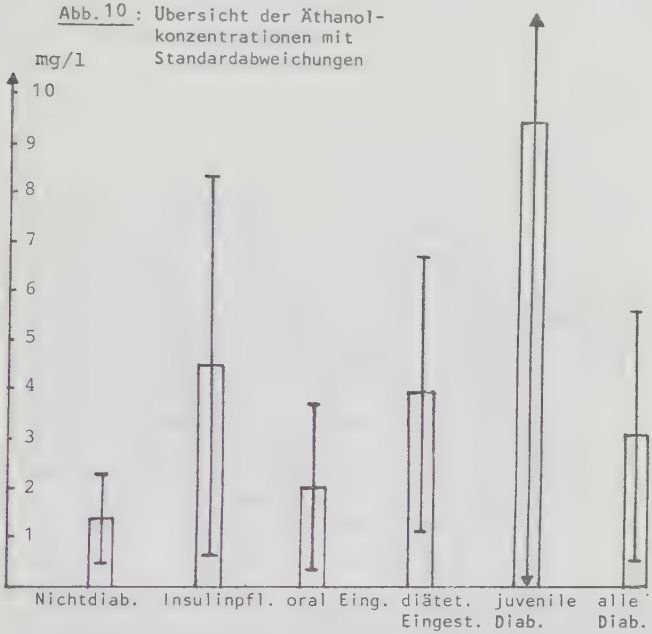
c) Nichtdiabetiker gegen oral Eingestellte:
$\tau = 1{,}5463$
Es ist kein Unterschied der Mittelwerte feststellbar.

d) Nichtdiabetiker gegen diätetisch Eingestellte:
$\tau = 4{,}6887$
Es besteht mit 99,9 % ein hoch signifikanter Unterschied.

e) Nichtdiabetiker gegen juvenile Diabetiker:
$\tau = 3{,}7158$
Es besteht mit 99,9 % ein hoch signifikanter Unterschied.

Abb. 10 zeigt graphisch zusammengefaßt Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen.

Abb. 10: Übersicht der Äthanolkonzentrationen mit Standardabweichungen



Geordnet nach fallendem Mittelwert der Äthanolkonzentration ergibt sich folgende Reihenfolge der Diabetikergruppen:

Juvenile Diab. > Insulinpflicht. > Diätet. > Oral Eingestellte > Normalpatienten.

2.1.2. Propanol

Die gemessenen Werte streuten zwischen 0 und 100 µg/l. Tabelle 9 zeigt wiederum die nach Nalimov bereinigten Mittelwerte $\bar{x}$, den Stichprobenumfang n und die Standardabweichung s für die Gruppe der Nichtdiabetiker, die 4 einzelnen Diabetikergruppen und das gesamte Diabetikerkollektiv in einer Gruppe.

Tabelle 9: Propanolwerte

	n	$\bar{x}$ (µg/L)	s
Nicht-Diabetiker	21	0,0	0,0
alle Diabetiker	153	11,392	10,4303
Insulinpflichtige	45	15,022	11,00
oral Eingestellte	24	0,0	0,0
diätet. Eingestellte	45	12,711	11,06
juvenile Diabetiker	26	20,038	15,09

Bei Nichtdiabetikern sowie auch oral eingestellten Diabetikern ergab sich nach Nalimov-Test keine Propanolkonzentration im Serum. Um die Sicherheit der schon in der Tabelle erkennbaren Unterschiede der Mittelwerte zu prüfen, wurden wieder im Rahmen eines t-Tests (siehe 2.1.1.) die Mittelwerte aller Gruppen mit dem Gruppe der Nichtdiabetiker verglichen.

a) Vergleich: Nichtdiabetiker - Sammelkollektiv aller Diab.:

= 4,5543

Der Unterschied der Mittelwerte ist mit einer statistischen Sicherheit von 99,9 % hoch signifikant.

b) Vergleich: Nichtdiabetiker - Insulinpflichtige:
= 5,8169
Der Unterschied ist (99,9 %) hoch signifikant.

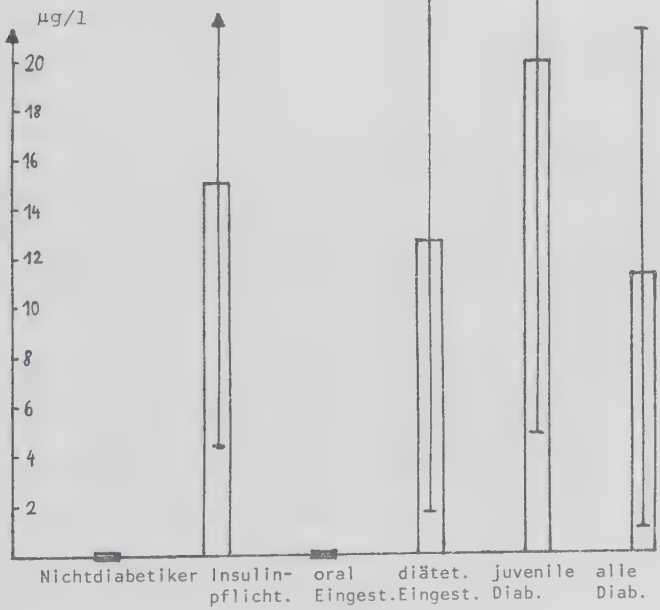
c) Vergleich: Nichtdiabetiker - oral Eingestellte:
= 0,00
Da beide Gruppen keine Propanolausscheidung aufweisen, ist kein Unterschied feststellbar.

d) Vergleich: Nichtdiabetiker - diätetisch Eingestellte:
= 4,8291
Der Unterschied ist (99,9 %) hoch signifikant.

e) Vergleich: Nichtdiabetiker - juvenile Diabetiker:
= 5,7692
Der Unterschied ist (99,9 %) hoch signifikant.

Abb. 11 zeigt graphisch zusammengefaßt Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen.

Abb. 11: Propanolkonzentrationen, mit Stand.abw.



Geordnet nach fallenden Mittelwerten der Propanolkonzentrationen ergibt sich folgende Reihenfolge der Diabetikergruppen:
Juvenile Diab. > Insulinpflicht. > Diätet. > Oral Eingestellte > Normalprobanden.

2.1.3. Isobutanol

Hier zeigt sich nach Nalimov-Test eine mittlere Konzentration, die in allen untersuchten Gruppen bei 0 µg/l liegt, also keine Isobutanol-Ausscheidung. Eine meßbare Isobutanol-Konzentration wurde bei den Nichtdiabetikern nur in 2 von 46, bei Insulinpflichtigen in 15 von 49, bei oral Eingestellten in 5 von 45, bei diätetisch Eingestellten in 10 von 51 und bei den juvenilen Diabetikern nur in 6 von 26 Proben gemessen, woraus sich das endgültige negative Ergebnis erklärt.

2.1.4. Butanol

Die gemessenen Ergebnisse streuten hier zwischen 180 und 0 µg/l im Serum.

Tabelle 10: Butanolwerte

	n	$(\mu g/l)^{\bar{x}}$	s
Nicht-Diabetiker	46	4,6410	3,073
alle Diabetiker	147	3,823	3,616
Insulinpflichtige	33	1,242	0,435
oral Eingestellte	40	6,525	6,168
diätetisch Eingestellte	47	4,27	3,652
juvenile Diabetiker	23	3,565	2,351

Die Vermutung, bei Diabetikern höhere Serumkonzentrationen an Butanol zu finden, ließ sich also bei keiner der untersuchten Gruppen gestätigen. Auch der Mittelwert der oral eingestellten Diabetiker ist nicht mit statistischer Sicherheit über den Normalwert erhöht, wie der t-Test ergab.

2.1.5. Isoamylalkohol

Bei der Bestimmung der Konzentrationen von Isoamylalkohol in insgesamt 217 Serumproben ließ sich die Hypothese einer bei Diabetikern erhöhten Serumkonzentration nicht bestätigen. Es ergab sich kein statistisch gesichert höherer Mittelwert als bei Nichtdiabetikern. Die gemessenen Konzentrationen lagen überdies in den meisten Fällen im Bereich der Nachweisgrenze.

2.2. Ergebnisse für die Diabetikergruppen

2.2.1. Gesamtgruppe aller Diabetiker

Mit einem Mittelwert von ca. 3,1mg/l liegt die mittlere Äthanolkonzentration mehr als zweimal so hoch wie die bei Nichtdiabetikern festgestellt, wobei der Unterschied mit nur 1 % Irrtumswahrscheinlichkeit statistisch signifikant ist. Die mittlere Propanolkonzentration ist mit ca. 11,4 µg/l hoch signifikant höher als der mit 0 µg/l bestimmte Mittelwert bei Nichtdiabetikern. Isobutanol läßt sich statistisch eindeutig nicht nachweisen, und ebenso ist bezüglich der Butanol- und Isoamylalkoholkonzentration keine statistisch sicher erhöhte mittlere Konzentration im Vergleich zur Referenzgruppe und den einzelnen Diabetikergruppen feststellbar. Die Werte im Vergleich mit dem Wert der anderen Gruppen sind in einer Übersicht noch einmal in Tabelle 11 in Abschnitt 2.2.6. zu finden.

2.2.2. Insulinpflichtige Diabetiker

Die mittlere Äthanolkonzentration liegt mit einem Mittelwert von ca. 4,6 mg/l Serum hoch signifikant etwa dreimal so hoch wie die bei Nichtdiabetikern mit ca. 1,5 mg/l gemessene. Sie liegt damit sowohl über dem Durchschnitt aller Diabetiker wie auch um mehr als das Zweifache über dem Wert für die oral eingestellten Diabetiker. Lediglich bei den juvenilen Diabetikern liegt der Wert um etwa 100 % höher.

Die mittlere Propanolkonzentration ist mit ca. 15 µg/l ebenfalls hoch signifikant höher als bei Normalpatienten ($\bar{x}$ = 0,0 µg/l) und wird unter den anderen Diabetikergruppen nur noch von den juvenilen Diabetikern mit ca. 20 µg/l übertroffen. Statistisch gesicherte Unterschiede bezüglich Isobutanol und Isoamylalkohol sind nicht feststellbar, die Butanolkonzentration hingegen liegt hoch signifikant niedriger als bei Normalprobanden.

2.2.3. Oral eingestellte Diabetiker

Der Mittelwert für die Äthanolkonzentration liegt zwar mit 2,0 zu 1,5 mg/l ein wenig höher als bei Nichtdiabetikern, der Unterschied ist jedoch nach t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von über 5 % behaftet und kann daher nicht als gesichert gelten. Im Vergleich mit den anderen Gruppen liegt der Mittelwert um über 50 % unter denen für die Insulinpflichtigen, ebenso im Vergleich mit den diätetisch Eingestellten und beträgt nur weniger als ein Viertel des Mittelwertes für juvenile Diabetiker.

Für Propanol wurde im Mittel dieser Gruppe kein meßbarer Serumspiegel ermittelt, was im Gegensatz zu den hohen Mittelwerten der anderen Diabetikergruppen steht. Ein Unterschied zu nichtdiabetischen Probanden konnte also ebenfalls nicht gefunden werden.

Auch für die Alkohole Isobutanol (kein Serumspiegel), Butanol und Isoamylalkohol fand sich kein statisch gesicherter Unterschied des Konzentrationsmittelwertes zu dem von Normalprobanden. Die mittlere Konzentration an Butanol

liegt allerdings mit über 6,5 µg/l deutlich höher als die für Insulinpflichtige mit 1,2 µg/l gefundene. Übersichtsdarstellung der Werte in Tabelle 11 in Abschnitt 2.2.6.

2.2.4. Diätetisch eingestellte Diabetiker

Der Mittelwert der Äthanolkonzentrationen ist mit 4,0 mg/l hoch signifikant höher als der bei Nichtdiabetikern festgestellte. Er liegt leicht über dem Durchschnitt aller Diabetiker (3,1), deutlich über dem der oral eingestellten Diabetiker (2,0), leicht unter dem für Insulinpflichtige (4,6) und deutlich unter dem Wert für juvenile Diabetiker (9,5 mg/l).

Für Propanol ergibt sich mit 12,7 µg/l ein hoch signifikanter Unterschied zum Mittelwert bei Nichtdiabetikern (0,0) und ebenso zu dem der oral eingestellten Diabetiker (0,0). Der Wert liegt tiefer als bei den Insulinpflichtigen (15,0) und juvenilen Diabetikern (20,0 µg/l), doch etwa im Bereich des Mittelwertes für alle Diabetiker gemeinsam.

Für Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol besteht kein statistisch gesicherter Unterschied des Konzentrationsmittelwertes zu dem der Nichtdiabetiker und der anderen Gruppen.

2.2.5. Juvenile Diabetiker

Der Mittelwert der Äthanolkonzentration ist mit ca. 9,5 mg/l der höchste aller untersuchten Gruppen und ist damit hochsignifikant höher als der der Nichtdiabetiker und mit 9,9 zu 4,6 mg/l immerhin mehr als doppelt so hoch wie der der Insulinpflichtigen.

Die gleiche Konzentration ergibt sich für die Mittelwerte der Propanolkonzentrationen: die juvenilen Diabetiker weisen mit 20,8 µg/l wieder den höchsten Mittelwert

auf , der gegenüber der Gruppe der Nichtdiabetiker (0,0 µg/l) hoch signifikant erhöht ist. Der Wert liegt damit auch um ca. 90 % über dem Mittelwert aus der Gruppe aller Diabetiker gemeinsam.

Auch hier ergeben sich für Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol keine signifikanten Unterschiede zu den Mittelwerten der Nichtdiabetiker und auch der übrigen Diabetikergruppen.

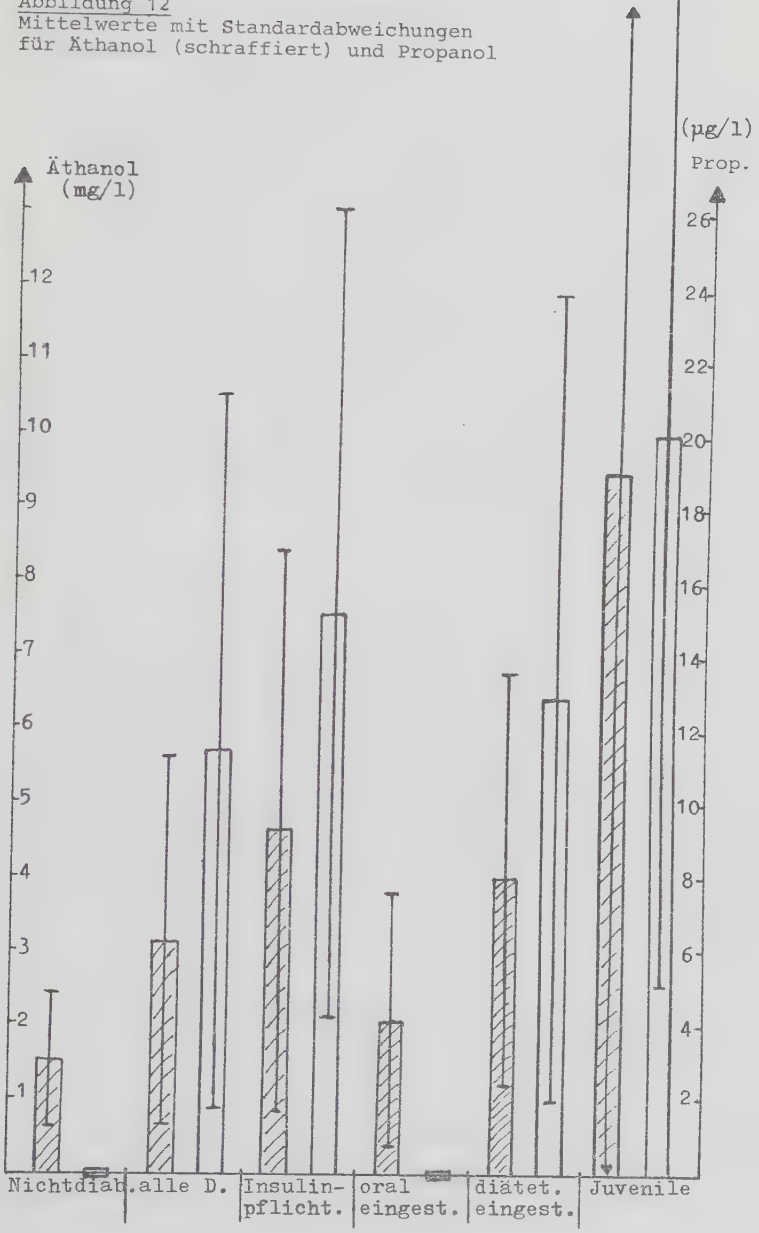
2.2.6. Übersicht

Tabelle 11 zeigt die Übersicht über die ermittelten Werte der Alkohole Äthanol und Propanol in allen Diabetikergruppen, zusammen mit den betreffenden Standardabweichungen, dem Stichprobenumfang sowie der Signifikanz der Unterschiede zum Mittelwert der Gruppe der Nichtdiabetiker (Sig. d. U.).

Tabelle 11 :

	Äthanol				Propanol			
	$\bar{x}$ (mg/l)	s	n	Sig. d.U.	$\bar{x}$ (ug/l)	s	n	Sig. d.U.
Sammelgrp. aller Diabetiker	3,1	2,5	134	99%	11,4	10,4	153	99,9 %
Insulin-pflicht.	4,6	3,9	44	99,9 %	15,0	11,0	45	99,9 %
Oral eingest.	2,0	1,7	37	-	0,0	0,0	24	-
diätet. eingest.	4,0	2,8	42	99,9 %	12,7	11,0	45	99,9
Juvenile	9,5	11,5	24	99,9 %	20,0	15,1	26	99,9 %

Abbildung 12
Mittelwerte mit Standardabweichungen
für Äthanol (schraffiert) und Propanol



2.3. Die Äthanol- und Propanolkonzentration in Verbindung mit anderen Parametern

Zur Vervollständigung der Untersuchung wurde zusätzlich, um mögliche Korrelationen mit anderen anamnestischen oder Laborparametern festzustellen, die Verteilung der Alkohole in bezug auf Blutzuckerspiegel und das Vorliegen diabetischer Komplikationen sowie einige Regressionen anderer Parameter gegeneinander geprüft. Auf eine Untersuchung hinsichtlich der Alkohole Butanol, Isobutanol und Isoamylalkohol wurde in diesem Rahmen verzichtet.

2.3.1. Alkoholwerte bei Vorliegen diabetischer Komplikationen

Als diabetische Komplikationen im Sinne dieser Untersuchung wurden verstanden:

- diabetische Mikro- und Makroangiopathie
- diabetische Nephropathie (diab. Nephrosklerose und Pyelonephritis)
- diabetische Polyneuropathie.

Die Angaben hierzu wurden den Krankenblättern der Patienten entnommen. Die Mittelwerte der Alkoholkonzentrationen waren:

Äthanol 3,9 mg/l
Propanol 12,7 µg/l.

Diese Werte liegen somit nur knapp über den Mittelwerten der Gesamtpopulation der Diabetiker. Ein signifikanter Anstieg der Alkoholkonzentration aufgrund der hier aufgeführten Komplikationen der Grunderkrankung ist also nicht zu erwarten.

2.3.2. Alkoholkonzentration im Zusammenhang mit Blutzuckerwerten

Von allen Probanden war am Tage der Probenentnahme zugleich ein Blutzuckertagesprofil mit Nüchternwert, 9^{oo}-Wert und 14^{oo}-Wert durchgeführt worden. Im Rahmen der

Auswertung wurden von jedem Patienten die Blutzuckermaximalwerte ($Bz_{max.}$) der Tagesprofile ermittelt und danach die gesamten Proben der Diabetiker statistisch in drei Gruppen eingeteilt.

- Proben von Diabetikern mit $Bz_{max.}$ unter 2o1 mg%
- Proben von Diabetikern mit $Bz_{max.}$ zwischen 201 u. 300mg%
- Proben von Diabetikern mit $Bz_{max.}$ über 300 mg%

Bei der Auswertung ergab sich in keiner der drei Gruppen eine nennenswerte Abweichung der Mittelwerte für Äthanol sowie für Propanol von den für die Gesamtheit aller Diabetiker zuvor gefundenen Werten. Eine Korrelation mit dem Blutzuckermaximalwert aus dem Tagesprofil läßt sich somit nicht feststellen, während über die Korrelation der Blutzuckersituation im Moment der Probenentnahme mit der hier durchgeführten Untersuchung keine Aussage gemacht werden kann.

2.3.3. Regressionsprüfungen

Geprüft wurden die Regressionen der Parameter

- C-Peptidspiegel gegen Serumäthanolspiegel
- Insulinspiegel gegen Serumäthanolspiegel
- C-Peptidspiegel gegen Serumpropanolspiegel
- Insulinspiegel gegen Serumpropanolspiegel

In keinem der geprüften Fälle ergab sich ein Korrelationskoeffizient von mehr als 0,1. Zwischen den geprüften Parametern besteht also keine Korrelation.

E. Zusammenfassung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der Methode der Massenfragmentographie anhand der Serumproben von 113 Probanden, davon 90 Diabetiker und 23 nichtdiabetische, stoffwechselgesunde Personen, Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung der Alkohole Äthanol, Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol im Serum durchgeführt, um der Frage nach einer diskutierten Steigerung der endogenen Bildung dieser Substanzen im Rahmen einer diabetischen Stoffwechselstörung nachzugehen.

Es ließen sich mit hoher statistischer Sicherheit (99,9%) Erhöhungen im Mittelwert der Äthanolkonzentrationen gegenüber dem Mittelwert bei Nichtdiabetikern in den Gruppen der insulinpflichtigen, der juvenilen und der diätetisch eingestellten Diabetiker nachweisen, wobei auch der Mittelwert der Gruppe, in der die Proben aller Diabetiker gemeinsam zusammengefaßt wurden, sich noch signifikant, also mit einer statistischen Sicherheit von 99%, von dem der Vergleichsgruppe unterschied. Lediglich der Mittelwert der Gruppe der mit oralen Antidiabetica eingestellten Diabetiker weist keinen statistisch gesicherten Unterschied zu dem der Nichtdiabetiker auf.

Der höchste Mittelwert fand sich in der Gruppe der juvenilen Diabetiker, gefolgt von der Gruppe insulinpflichtiger Patienten, die definitionsgemäß keinen juvenilen Diabetiker enthielt.

Bezüglich der Propanolkonzentration im Serum der Probanden fanden sich nahezu identische Verhältnisse. Im Serum von Normalprobanden fand sich kein Propanol, das hingegen in den Proben von insulinpflichtigen, juvenilen und diätetisch eingestellten Patienten nachgewiesen wurde. Der Unterschied der Mittelwerte dieser

Gruppen zu dem der Vergleichsgruppe war in allen drei Fällen mit einer statistischen Sicherheit von 99,9% hochsignifikant. Lediglich in der Gruppe der oral eingestellten Diabetiker fand sich wiederum kein statistisch gesicherter Unterschied zu der Gruppe der gesunden Probanden.

Eine Ursache für die erkennbare Sonderstellung der mit oralen Antidiabetica eingestellten Diabetiker sowohl in bezug auf die Äthanol- wie auf die Propanolkonzentration im Serum ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht näher erforschen; doch läßt das Ergebnis in den übrigen Gruppen die Vermutung zu, daß es in den Fällen besonders schwerer Stoffwechselstörung, wie sie gerade bei den juvenilen Diabetikern und, in etwas gemilderter Form, bei den übrigen insulinpflichtigen Diabetikern besteht, in besonders hohem Maße zu einer endogenen Bildung von Äthanol und Propanol kommt.

Die exakte Prüfung der Frage, wie eng die Korrelation zwischen der Konzentration dieser beiden Alkohole im Serum und dem Schweregrad der Erkrankung ist, setzt einen geeigneten Parameter für diesen Schweregrad voraus, wie man ihn vielleicht in den vor einer Therapie festzustellenden postprandialen Werten für Seruminsulin- und Blutzucherspiegel finden könnte. Dies erfordert jedoch weit umfangreichere Untersuchungen und einen deutlich größeren Aufwand, als es im Rahmen dieser Arbeit möglich war.

Die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie, die Massenfragmentographie, hat sich in jedem Falle bei der durchgeführten Untersuchung als gut geeignetes Verfahren zur Alkoholbestimmung auch in größerem Umfange bei besonders hoher Empfindlichkeit bewährt.

F. Literaturverzeichnis

1) Huesgen, G.:
Die quantitative Bestimmung von Hetanon-4 und Heptanon-2 im Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Diabetes mellitus.
Dissertation Tübingen 1978.

2) Jain, N. C.:
Direct Blood-Injection Method for Gas Chromatographic Determination of Alcohols and Other Volatile Compounds.
Clinical Chemistry 17 82-85 (1971)

3) Kaiser, R. und G. Gottschalk:
Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten.
Mannheim: Bibliographisches Institut 1972.

4) Liebich, H. M. und O. Al-Babbili:
Gas Chromatographic - Mass Spectrometric Study of Volatile Organic Metabolites in Urines of Patients with Diabetes Mellitus.
J. of Chrom. 111 539-550 (1975).

5) Liebich, H. M. und J. Wöll:
Volatile Substances in Blood-Serum: Profile Analysis and Quantitative Determination.
J. of Chrom. 142 506-516 (1977).

6) Liebich, H.M.:
Massenspektrometrie und kombinierte Techniken in Medizin, klinischer Chemie und klinischer Biochemie.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 677-686 (1978).

7) Lyons, H. und J. Bard:
Gas Chromatographic Determination of Lower Alcohols in Biologic Samples.
Clin. Chem. 10 429-432 (1964).

8) Mather, A. und A. Assimos:
Evaluation of Gas-Liquid Chromatography in Assay for Blood Volatiles.
Clin. Chem. 11 1023-1035 (1965).

9) Mittmeyer, H.-J.:
In vitro Untersuchungen über die Veränderungen des Alkoholgehaltes länger gelagerter Rinderblutproben.
Blutalkohol 9 98-103 (1972).

10) Seibel, J.:
Massenspektrometrie.
Frankfurt a. M.: Akademische Verlagsgesellschaft (1970).

11) Stoner, E., D. Cowburn und L. C. Craig:
Examination of Volatile Metabolites in Plasma.
Anal. Chem. 47 344-345 (1975).

12) Sweeley, C. C., W. H. Elliot, J. Fries und R. Ryhage:
Mass Spectrometric Determination of Unresolved Components in Gas Chromatographic Effluents.
Anal. Chem. 38 1549-1553 (1966).

13) Zlatkis, A., W. Bertsch, D. A. Bafus und H. M. Liebich:
Analysis of Trace Volatile Metabolites in Serum and Plasma.
J. of Chrom. 91 979-383 (1974).

Lebenslauf

Am 29. Juli 1953 wurde ich, Ralph Herbert Kallmayer, als zweiter Sohn des Verlagskaufmannes Herbert Kallmayer und seiner Ehefrau Margit, geb. Stärz, in Bad Kreuznach geboren. Nach dem Wechsel unseres Wohnsitzes besuchte ich von 1960 an die Grundschule in Hameln an der Weser und von 1964 an den altsprachlichen Zweig des Schiller-Gymnasiums Hameln, wo ich im Jahre 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Juli 1972 begann meine Dienstzeit bei der Bundeswehr, die ich als Zeitsoldat für zwei Jahre bei der Fernmeldetruppe des Heeres ableistete.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mein Medizinstudium auf und trat zugleich für ein Jahr in das dortige Leibniz-Kolleg ein, das sich die Pflege des Studium generale zum Anliegen gemacht hat.

Nach der Ärztlichen Vorprüfung im Sommer 1976 begann ich im Frühsommer 1977 mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation, absolvierte im Jahre 1977 den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung und im Jahre 1979 deren zweiten Teil, nachdem ich im Mai geheiratet hatte.

Im Oktober 1980 endete mein Medizinstudium mit dem dritten Teil der ärztlichen Prüfung, den ich am 23. Oktober in Tübingen bestand.

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545/8791